Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Bock

Untersuchungen über den Cholesteringehalt verschiedener Organe von weißen Mäusen nach Applikation verschiedener schilddrüsenhormonartig wirkender Substanzen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

SIEGFRIED GERHARD MALL

aus Tübingen

8138

1965

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Bock

Untersuchungen über den Cholesteringehalt verschiedener Organe von weißen Mäusen nach Applikation verschiedener schilddrüsenhormonartig wirkender Substanzen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

SIEGFRIED GERHARD MALL

aus Tübingen

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Dekan: Prof. Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hillmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bock

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	5
MATERIAL UND METHODEN	9
Versuchtstiere	9
Injektionslösungen	9
Versuchsdurchführung	11
Dünnschichtchromatographie	12
Cholesterinbestimmung	12
ERGEBNISSE	13
Automatisierte Cholesterinbestimmung	13
Dünnschichtchromatographie	19
DISKUSSION	26
ZUSAMMENFASSUNG	27
LITERATURVERZEICHNIS	28
LEBENSLAUF	31

EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit handelt von der Wirkung des Thyroxins und analoger Verbindungen auf den Cholesteringehalt verschiedener Organe von weißen Mäusen.

Nach F. Hoch (1) scheint ein Stoff, der eine schilddrüsenhormonartige Wirkung haben soll, eine bestimmte Struktur der Phenolgruppe haben zu müssen, und zwar muß die Phenolgruppe eine chinoide Anordnung erlauben. So erweisen sich Isomeren, bei denen die Hydroxylgruppe in 3-Stellung und die Jodatome in 2,4-Stellung liegen, als oxydabel und hormonaktiv (Niemann, Redeman, 2). Eine ähnliche Konfiguration zeigt auch das 2,4-Dinitrophenol, dessen grundumsatzsteigernde Wirkung schon lange bekannt ist.

Die Wirkung der Schilddrüsenhormone erstreckt sich nicht nur auf den Grundumsatz, sondern auch auf den Eiweiß-, Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, sowie Vitamin- und Jonenhaushalt des Säugetierorganismus.

Eiweißstoffwechsel:

Die Proteinsynthese wird durch kleine Gaben von Thyroxin stimuliert und durch größere Gaben gedrosselt. Intraperitoneale Injektion von 100 µg L-Thyroxin bei Ratten über 6 bis 16 Tage steigert die D, L-Leucin-1-C^{14}- und die D, L-Valin-1-C^{14}-Inkorporation. Höhere Dosierung von Thyroxin hemmt die Proteinsynthese in Vitro und in Vivo (Sokoloff, Kaufmann u.a., 3). Bei thyreoidektomierten Kaninchen ist die Synthese der Serumantikörper langsam. Thyroxin steigert diese Syntheserate über die Norm (I. L. Trapani, 4). Ebenso wie Thyroxin steigert auch das 2,4-Dinitrophenol die Proteinsynthese.

Kohlenhydratstoffwechsel:

Bei Thyreotoxikose ist die Glykogensynthese abgeschwächt. Der Leber- und Muskelglykogengehalt ist markant vermindert. Das Gehirnglykogen ist bis zu 36 % vermindert (Protop 5). Auch das 2,4-Dinitrophenol senkt bei Ratten den Leber- und Muskelglykogengehalt (Murano, Yasuda, Rhee, Uenshi und Ueda, 6).

Vitaminhaushalt

Die freie Thiamin- und Diphosphothiaminconcentration fällt im Blut bei Hyperthyreose ab. Die Thiaminconcentration ist in der Leber niedrig, im Urin wird Thiamin aber in großen Mengen ausgeschieden (Williams, Egana, Robinson, Asper, Dutoit, 7).

Die Pyridoxin- und Pyridoxalphosphatconcentration sind in Leber und Herz thyroxinbehandelter Tiere beträchtlich vermindert (Labouesse, Chatagner, Jollès - Bergeret, 8; Mascitelli, Coriandoli und Boldrini, 9). Nach Thyreoidektomie ist das Pyridoxal-5-Phosphat der Leber gesteigert (Labouesse, Jollès - Bergeret und Chatagner, 8).

Vitamin B_{12} ist im Gewebe thyreotoxischer Tiere vermindert.

Vitamin C zeigt keine bestimmte Beziehung zur Thyreotoxikose (Rawson, Rall und Sonenberg, 10). Die Vitamin-A-Synthese erfordert Schilddrüsenhormone. Beim Hypothyreoiden ist die Serum-Vitamin-A-Concentration vermindert (durch Blockade der Umwandlung von Carotin in Vitamin A (Drill und Truant, 11).

Jonenhaushalt

Der Phosphorstoffwechsel wird unter Thyreoideahormoneinfluß gesteigert. Bei der menschlichen Thyreotoxikose tritt eine negative Phosphorbilanz auf. Der Phosphorverlust erfolgt durch den Urin und durch die Faeces (Rawson, Rall, Pearson, Robbins, Popell und West, 12).

Der Calciumstoffwechsel ist gelegentlich gesteigert bei der Hyperthyreose und extrem beim Hyperparathyreoidismus. Die stärkste Steigerung wurde im Knochen beobachtet. Die $Calcium^{45}$-Umsatzrate im Knochen thyreotoxischer Patienten ist gesteigert und kehrt nach erfolgreicher Behandlung wieder zur Norm zurück.

Magnesium beeinflußt die oxydative Phosphorylierung in den Mitochondrien und modificiert hierdurch die Schilddrüsenhormonwirkung. Magnesium ist ein Antagonist der entkoppelnden Wirkung der Schilddrüsenhormone in den Mitochondrien. Eine magnesiumreiche Diät schützt vor der entkoppelnden Wirkung der Thyreoideahormone.

Fettstoffwechsel

Mit der Wirkung von Jodthyroninen auf den Lebercholesterinstoffwechsel beschäftigten sich Scaife und Migikowsky (13). Sie fanden in Leberhomogenaten hyperthyreoider Ratten einen, gegenüber der Norm, verminderten Cholesterinspiegel. Marx u.a. (14) fanden hingegen in Isotopenversuchen eine Erhöhung der Cholesterinsynthese. Bei diesen Versuchen wurden Gewebeschnitte in, mit Deuterium und Tritium angereichertem, Wasser oder Acetat incubiert. Für eine gesteigerte Cholesterinsynthese sprechen auch die Ergebnisse von Frieman (15), der bei hyperthyreoiden Ratten eine gesteigerte Sterinsekretion in die Galle fand. Diese Sekretionssteigerung ließ sich durch Thiouracil hemmen. Mit Trijodthyronin behandelte Ratten scheiden mehr Taurochenodesoxycholsäure aus und weniger Taurocholsäure, als hypothyreoide Ratten. Versuche von Fletcher und Myant (16) demonstrierten, daß die Cholesterinsynthese aus Acetat in mitochondrienfreien Rattenleberextracten nach Gaben von 20 µg Thyroxin anstieg und nach Gaben von 50 µg wieder abfiel. Fraenkel - Conrat und Greenberg fanden an Ratten, daß die Wirkung der Thyreoideahormone auf eine Steigerung der Acetyl Co-A Concentration zurückzuführen ist. Sie fanden in den Lebern hyperthyreoider Ratten einen geringeren Acetyl Co-A-Gehalt als in der Leber normaler Tiere. Die entsprechenden Ergebnisse fanden Hung (17) bei Tauben und Gershberg, Kuhl (18) beim Menschen. Turchetto, Sanguinetti und Rossi (19) wiesen darauf hin, daß, um einen normalen Leber-Acetyl-Co-A-Spiegel zu gewährleisten, sowohl eine ausreichende Menge Thyroxin, als auch ausreichende Mengen Panthothensäure vorhanden sein müssen. Tabachnick und Bonnycastle (20) wiesen darauf hin, daß der Acetyl Co-A-Anstieg bei thyreoidektomierten Ratten die Norm überschritt, wenn man Thyroxin verabreicht hatte. Mit der oben schon beschriebenen Methode der Incubierung von Gewebeschnitten in markiertem Wasser, konnten Marx und Mitarbeiter auch eine deutliche Steigerung der Fettsäurensynthese in der Leber registrieren. Fletcher und Myant zeigten im mitochondrienfreien Rattenleberextract nach Applikation von 20 µg Thyroxin einen Anstieg der Fettsäurensynthese, während, parallel zur Cholesterinsynthese, die Fettsäuresynthese nach Gaben von 50 µg wieder absank. Nach Ergebnissen von Flock, Bollman und Berkson (22) wird auch die Phospholipoidsynthese in der Rattenleber gesteigert, während sie durch Thiouracil gehemmt wird.

Die Erhöhung des Cholesterinspiegels im Serum bei Hypothyreose war schon lange bekannt. Thyroxin senkt den Cholesterinspiegel. Der Serumcholesterinspiegel ist aber nicht nur abhängig von der Schilddrüsenfunktion, sondern auch stark nutritiven Einflüssen unterworfen. Daneben dürften auch konstitutionelle Faktoren eine große Rolle spielen. Die klinischen Beobachtungen, daß bei Unterernährung der Serumlipoidspiegel abfällt, konnten von Entenman, Chaikoff und Reichert (23) im Tierversuch bestätigt werden. Die Autoren konnten die, bei thyreoidektomierten Ratten auftretende Hyperlipämie, durch Mangelernährung verhindern. Bemerkenswert sind ferner die Ergebnisse von Ershoff, Greenberg und Deuel (24), die im Tierexperiment die toxischen Wirkungen hoher Thyroxingaben durch fett- und cholesterinreiche Nahrung abschwächen konnten. Die selben Wirkungen, wie sie das Thyroxin auf den Blutcholesterinspiegel hat, lassen sich, wenn auch quantitativ verschieden, bei Trijodthyronin und anderen Jodthyroninderivaten beobachten. Ebenso, wie auf den Blutcholesterinspiegel, wirkt das Thyroxin auch auf die Neutralfette, Phospholipoide und ß-Lipoproteide im Serum (Peters, Gräsböck und Strisower, 25), d.h. die Concentration der obengenannten Stoffe fällt bei Thyroxinapplikation ab, und zwar tritt die Erniedrigung des Serumlipoidspiegels ein, noch bevor eine Grundumsatzsteigerung erkennbar ist (Abelin, Kürsteiner, 26). Rich, Bierman und Schwartz (27) wiesen nach, daß Trijodthyronin und Trijodthyreoessigsäure die Blutconcentration der unveresterten Fettsäuren beim Menschen innerhalb von 6 Stunden erhöht. Trijodthyronin steigert die Empfindlichkeit des Rattenorganismus gegenüber der fettmobilisierenden Wirkung des Noradrenalins (Goodman und Knobil, 28), und des Insulins (Haben, 29). Die Fettsäurenoxydationsrate ist in Muskel- und Herzhomogenaten (Deitrich und Smith, 30), sowie in Lebermitochondrien (Hoch und Lipman, 31) von, mit Thyroxin vorbehandelten Ratten, verstärkt, noch bevor eine Grundumsatzsteigerung festzustellen ist. Thyroxin und seine Derivate verhindern bei cholesterinreich ernährten Hühnern, die sonst auftretende Arteriosklerose. Trotter (32), Dauber, Horlick und Katz (33) fanden bei hypothyreoiden Patienten mit Coronarsklerose, daß Trijodthyreoessigsäure eine Senkung des Cholesterinspiegels ohne Grundumsatzsteigerung zur Folge hatte, wie sie sonst bei Schilddrüsenhormonen aufzutreten pflegt. Wainfan, Marx und Rittenberg (34) beobachteten, daß die Cholesterinoxydationsrate nicht nur im Säugetierorganismus gesteigert wird, sondern auch im Mikroorganismus.

Angesichts dieser Beobachtungen schien es uns wünschenswert, die Frage zu prüfen, welche Veränderungen des Lipoidstoffwechsels im Tierexperiment sich als sofort eintretende Folge parenteraler Applikation von Thyroxin und einiger seiner Derivate beobachten ließen. Wir berücksichtigten dabei nicht nur die bis dahin untersuchten Organe: Leber, Muskel, Herz und Serum, sondern auch noch Nieren und Gehirn.

MATERIAL UND METHODIK

Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche weiße Mäuse benutzt, welche wir vom Max - Planck - Institut für Virusforschung in Tübingen bezogen hatten. Die einzelnen Tiere hatten ein Gewicht zwischen 25 und 30 g. Die Ernährung bestand aus Latz-Mäusekraftfutter und Wasser.

Injektionslösungen

10^{-5} molare Thyroxinlösung: Es wurden 10^{-5} Mol Thyroxin (MG = 776,97) = 7,8 mg abgewogen, in 10 ml 0,01 molarer NaOH gelöst und mit 0,05 normaler Na_2PO_4-Lösung auf P_H 8,0 gebracht. Mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten wir auf 10^{-5} Mol. Die 10^{-5} molaren Lösungen von 2,4-Dinitrophenol und Tetrajodthyreoessigsäure wurden wie die Thyroxinlösung hergestellt.

10^{-5} molare Trijodthyroninlösung: 10^{-5} Mol Trijodthyronin (MG = 687) = 6,9 mg wurden abgewogen, in 100 ml einer Mischung von 96 % igem Äthanol und 0,1 normaler HCL (im Verhältnis 1 : 1) gelöst und mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 10 verdünnt.

10^{-5} molare Thyroxaminlösung: 10^{-5} Mol Thyroxamin (MG = 748,97) = 7,5 mg wurden abgewogen, in 10 ml Propylenglykol gelöst und mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine Molarität von 10^{-5} gebracht.

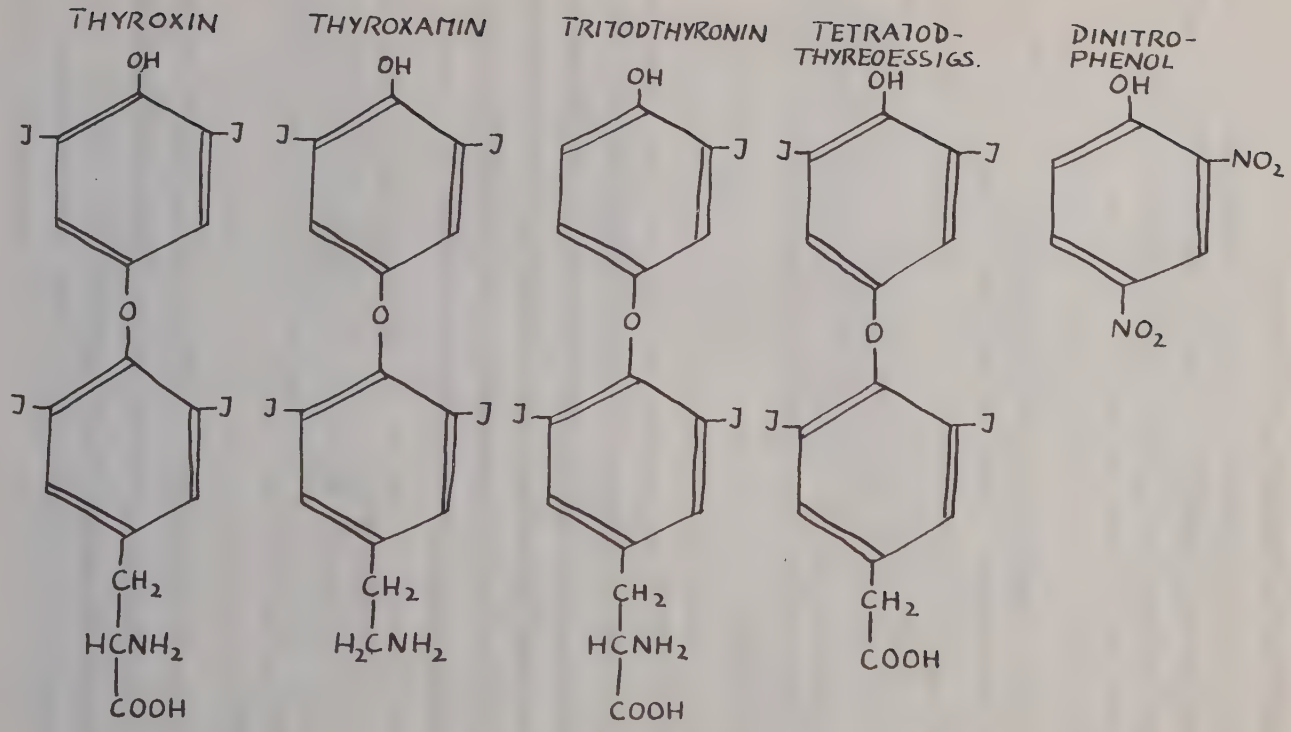

Abb. 1 zeigt die Strukturformeln der Injektionssubstanzen

Versuchsdurchführung

Den Mäusen spritzten wir 0,3 ml der 10^{-5}molaren Lösungen: Thyroxin, Thyroxamin, Tetrajodthyreoessigsäure, Trijodthyronin und 0,36 ml 2,4-Dinitrophenol. Die Menge der Substanz, welche einer Maus injiziert wurde, und die Zeit der Tötung nach der Injektion ergibt sich aus der folgenden Tabelle (Es wurde intraperitoneal injiziert.).

TABELLE 1:

Zeit der Tötung nach Injectio	Thyroxin 2,3 Gamma	Thyroxamin 2,2 Gamma	Trijodthyronin 2,1 Gamma	Tetrajod-Th. Ess. S. 2,2 Gamma	Dinitrophenol, 0,67 Gamma
0,5	Gruppe A1	Gruppe B1	Gruppe C1	Gruppe D1	Gruppe E1
1	Gruppe A2	Gruppe B2	Gruppe C2	Gruppe D2	Gruppe E2
2	Gruppe A3	Gruppe B3	Gruppe C3	Gruppe D3	Gruppe E3
4	Gruppe A4	Gruppe B4	Gruppe C4	Gruppe D4	Gruppe E4

Jede Gruppe bestand aus 10 Tieren, weil die Mäuseorgane für eine Einzelverarbeitung zu klein sind. Die Tiere der Gruppen A1 - E1 wurden eine halbe Stunde nach der Injektion getötet, diejenigen der Gruppen A2 - E2 eine Stunde, die Gruppen A3 - E3 zwei Stunden und die Gruppen A4 - E4 vier Stunden nach der Injektion. 10 unbehandelte Tiere wurden getötet, um Normalwerte zu erhalten. Für die Untersuchungen benutzten wir Gehirn, Leber, Herz, Nieren und quergestreifte Muskulatur (musculus quadriceps femoris). Die Organe wurden sofort, nachdem die Maus in Chloroform getötet und zur Blutentnahme decapitiert worden war, gewogen, mit der 10-fachen Menge des Organgewichtes Isopropanol versetzt und im Starmix 100 sec. lang bei höchster Umdrehungszahl homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat 20 Minuten lang am Rückflußkühler zum Sieden gebracht, filtriert und mit Isopropanol wieder auf das ursprüngliche Volumen gebracht, sodaß ein 10-fach verdünnter Organextract vorlag.

Serum: Das Blut von den Tieren einer Gruppe war bei der Decapitation entnommen worden und wurde 10 min. lang bei 3 000 U/min centrifugiert, das Serum abpipettiert und mit der 10-fachen Menge Isopropanol versetzt, dann filtriert und wieder mit Isopropanol auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

Dünnschichtchromatographie

Die Glasplatten wurden mit einer Mischung von Kieselgel G nach Stahl und Wasser, im Verhältnis 30 : 70, mit einer Schichtdicke von 0,25 mm beschichtet. Nachdem die Platten getrocknet waren, wurden die Extracte (10 µl) auf einer Breite von je 15 mm aufgetragen. Als Laufsystem wurde Chloroform benutzt, zur Färbung diente Phosphormolybdänsäure, (10 g gelöst in 90 ml Äthanol). Das Entwickeln der Farbe geschah 2 - 5 min lang bei einer Temperatur von 110°, bis die Banden dunkelblau und die Platten citrongelb gefärbt waren. Die Extinctionsmessung geschah an dem Zeiss-Spectrophotometer PMQ 2 mit einem Vorsatzgerät. In diesem Vorsatzgerät konnten die 4 x 20 cm großen Platten so durchgezogen werden, daß ein, durch eine 1 mm große Blende hindurchtretender Lichtstrahl, von bestimmter Wellenlänge, die Banden der Platten millimeterweise abtastete und so die Extinction feststellte. Die Wellenlänge betrug 532 m µ. Die quantitative Auswertung der erhaltenen Kurven erfolgte planimetrisch (Abb. 8-13).

Bei der von Zöllner angegebenen Methode (35) wurde ebenso beschichtet wie schon oben beschrieben. Als Laufsystem kam hier 99 % Petroläther (Kp 50 - 70°) und 1 % Isopropanol zur Anwendung. Zur Anfärbung wurde Antimontrichlorid (25 g in 75 ml Chloroform gelöst) benutzt. Die Entwicklung der Farbe geschah bei einer Temperatur von 110° im Brutschrank bis die Banden violett gefärbt waren. Dies dauerte zwischen 2 und 5 Minuten. Die Extinction wurde auf die oben schon beschriebene Weise gemessen. Die dabei benutzte Wellenlänge war 575 m µ.

Cholesterinbestimmung am Autoanalyzer

Die Messung der Gesamtcholesterinwerte erfolgte am Autoanalyzer der Firma Technicon, nach der von dieser angegebenen Methode. Die dazu benötigten Reagenzien sind: H_2SO_4 (Konz. 96 - 97 % von der Firma Merck) und eine Lösung von 0,5 g $FeCL_3 + 6\ H_2O$ gelöst in 950 ml aldehydfreiem Eisessig und 50 ml Aquadest. Für die Messung wurde die Blende 3 und ein Filter von 525 m µ eingelegt. Zunächst wurde mit Hilfe von Standardlösungen eine Eichkurve angelegt und dann die einzelnen Substrate gemessen. Die Meßergebnisse sind in der Tabelle 2 und in den Abbildungen 2 bis 7 wiedergegeben.

ERGEBNISSE

Automatisierte Cholesterinbestimmung

TABELLE 2:

Organ	Zeit	TX	TR	TA	TT	DNP
Gehirn	N	1775	1775	1775	1775	1775
	30′	1580	1259	1290	1120	--
	1 h	--	--	1390	--	--
	2 h	2120	1490	1580	1570	1190
	4 h	1160	1130	1540	1190	2740
Leber	N	444	444	444	444	444
	30′	600	488	544	329	475
	1 h	494	468	496	438	--
	2 h	658	520	525	329	475
	4 h	500	475	560	345	409
Niere	N	612	612	612	612	612
	30′	572	690	--	618	516
	1 h	916	698	780	394	546
	2 h	640	525	666	516	600
	4 h	--	694	888	374	--
Herz	N	344	344	344	344	344
	30′	368	376	484	453	348
	1 h	580	454	444	387	420
	2 h	--	309	340	380	370
	4 h	278	436	484	544	342
Muskel	N	275	275	275	275	275
	30′	300	278	288	588	305
	1 h	440	394	380	244	365
	2 h	370	301	280	153	209
	4 h	358	328	276	241	250
Serum	N	99	99	99	99	99
	30′	99	82	75	43	117
	1 h	77	72	90	35	81
	2 h	68	88	91	72	72
	4 h	84	86	71	69	102

Die Tabelle zeigt die am Autoanalyzer gefundenen Cholesterinwerte der einzelnen Organe, von Tieren, die verschiedene Zeiten nach der Injektion getötet wurden: 30′ und 1 h, 2 h, 4 h. Zeichenerklärung für die obige Tabelle und folgende Kurven:

TX = Thyroxin, TR = Trijodthyronin,

TA = Thyroxamin, TT = Tetrajodthyreoessigsäure,

DNP = 2,4-Dinitrophenol, N = Normalwert.

Auf den Abbildungen 2 bis 7 sind die Meßergebnisse, die wir durch den Autoanalyzer erhielten, graphisch wiedergegeben. Auf den Ordinaten ist der Gesamtcholesteringehalt in mg % aufgetragen und auf der Abszisse die Zeit in Stunden.

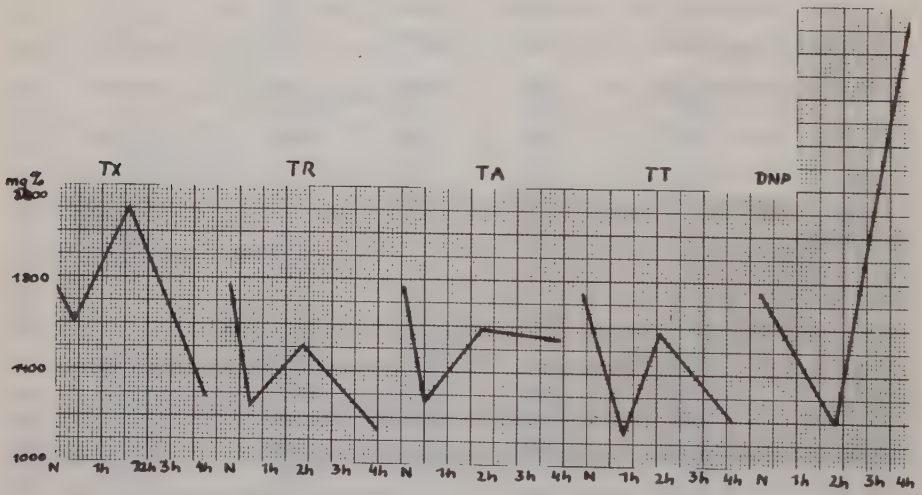

ABB. 2: Cholesteringehalt des Gehirnes

Abb. 2 zeigt das Verhalten des Gehirncholesterinspiegels zu verschiedenen Zeiten (30', 1 h, 2 h, 4 h) nach der Injektion von 3×10^{-9} Mol Thyroxin, Trijodthyronin, Thyroxamin, Tetrajodthyreoessigsäure und $3{,}6 \times 10^{-9}$ Mol Dinitrophenol. N gibt den Cholesterinwert unbehandelter Tiere als Normalwert an. Auf der Ordinate ist der Cholesteringehalt in mg % und auf der Abszisse die Zeit in h angegeben. Die Werte erhielten wir durch den Autoanalyzer.

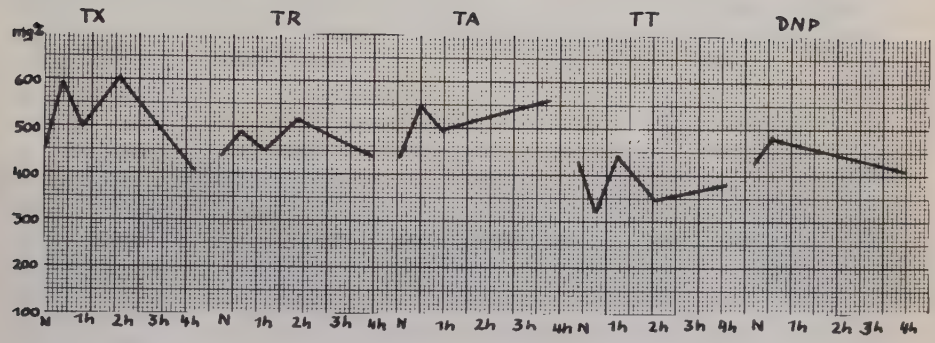

ABB. 3: Cholesteringehalt der Leber

Abb. 3 zeigt das Verhalten des Lebercholesterinspiegels zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion von 3×10^{-9} Mol Thyroxin, Trijodthyronin, Thyroxamin, Tetrajodthyreoessigsäure und $3{,}6 \times 10^{-9}$ Mol 2,4-Dinitrophenol. N gibt den Normalwert an von unbehandelten Tieren. Auf der Ordinate ist der Cholesteringehalt in mg %, und auf der Abszisse die Zeit in h angegeben. Die Werte erhielten wir durch den Autoanalyzer.

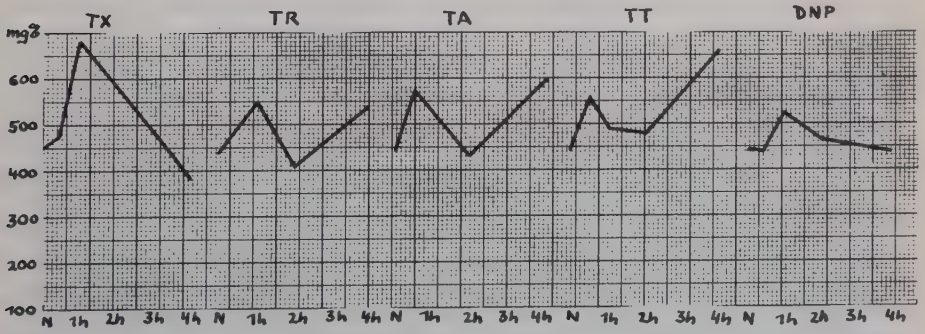

ABB. 4: Cholesteringehalt des Herzmuskels

Abb. 4 zeigt das Verhalten des Herzmuskelcholesteringehaltes zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion von 3 x 10^{-9} Mol Thyroxin, Trijodthyronin, Thyroxamin, Tetrajodthyreoessigsäure, und 3,6 x 10^{-9} Mol 2,4-Dinitrophenol. Auf der Ordinate ist der Cholesteringehalt in mg % aufgetragen und auf der Abszisse die Zeit in h. N ist der Normalwert unbehandelter Versuchstiere.

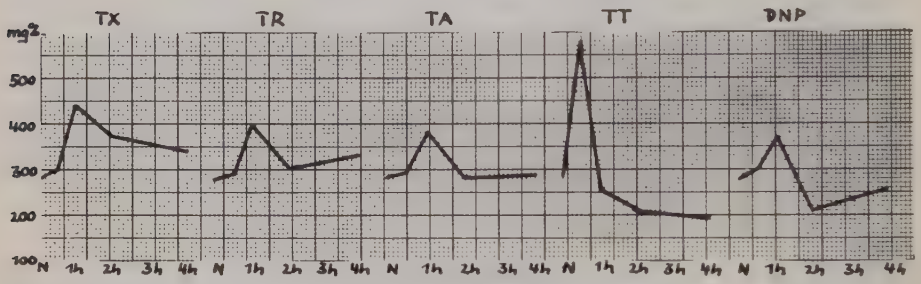

ABB. 5: Cholesteringehalt der quergestreiften Muskulatur

Abb. 13 zeigt das Verhalten des Cholesteringehaltes von quergestreifter Muskulatur zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion von 3 x 10^{-9} Mol Thyroxin, Trijodthyronin, Tetrajodthyreoessigsäure, Thyroxamin und 3,6 x 10^{-9} Mol 2,4-Dinitrophenol. N gibt die Normalwerte unbehandelter Versuchstiere an. Auf der Ordinate ist der Cholesteringehalt in mg %, und auf der Abszisse die Zeit in h aufgetragen.

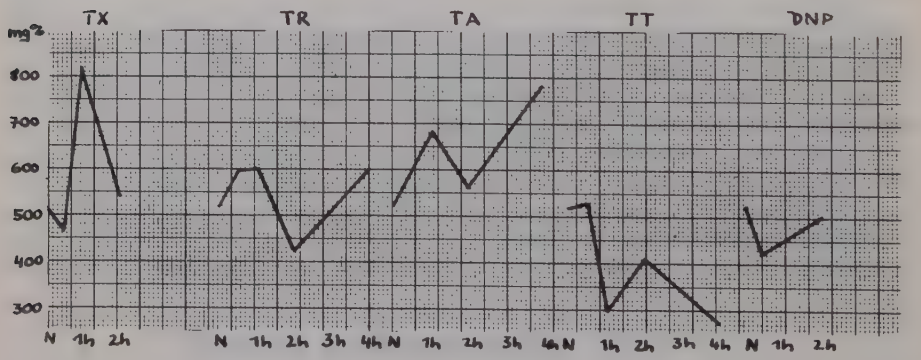

ABB. 6: Cholesteringehalt der Nieren

Abb. 6 zeigt das Verhalten der Nierencholesterins zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion von 3×10^{-9} Mol Thyroxin, Trijodthyronin, Thyroxamin, Tetrajodthyreoessigsäure und $3{,}6 \times 10^{-9}$ Mol 2,4-Dinitrophenol. N ist der Normalwert unbehandelter Versuchstiere. Auf der Ordinate ist der Cholesteringehalt in mg % und auf der Abszisse die Zeit in h aufgetragen.

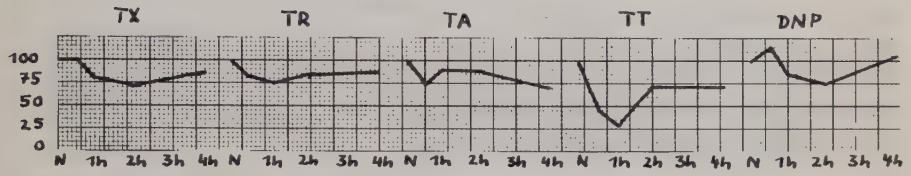

ABB. 7: Cholesteringehalt im Serum

Abb. 7 zeigt den Cholesterinspiegel im Serum zu verschiedenen Zeiten nach Injektion von 3×10^{-9} Mol Thyroxin, Trijodthyronin, Thyroxamin, Tetrajodthyreoessigsäure und $3{,}6 \times 10^{-9}$ Mol 2,4-Dinitrophenol. N gibt den Normalwert an von unbehandelten Versuchstieren. Auf der Ordinate ist der Serumcholesterinspiegel in mg %, und auf der Abszisse die Zeit in h angegeben.

WIRKUNG DER SUBSTANZEN AUF DAS GEHIRN (Zu Abb. 2)

In der ersten Stunde nach der Injektion sank der Cholesterinspiegel ab, zum Teil bis zu 30 %, um dann in der 2. Stunde einen Gipfel zu erreichen. Bei Trijodthyronin, Thyroxamin und Tetrajodthyreoessigsäure blieb dieser Gipfel aber noch unter der Norm, während er bei Thyroxin die Norm um 15 % überschritt, dann fielen die Werte bei allen vier Substanzen (Thyroxin, Trijodthyronin, Thyroxamin und Tetrajodthyreoessigsäure) wieder ab (bei Thyroxin und Trijodthyronin sogra bis zu 30 % unter die Norm). 2,4-Dinitrophenol bildete eine Ausnahme: In der zweiten Stunde lag der Wert 30 % unter der Norm, um dann in der vierten Stunde mit einem auffallenden Gipfel die Norm um 40 % zu überschreiten, sodaß der Cholesteringehalt des Gehirns 2,74 % betrug.

WIRKUNG DER SUBSTANZEN AUF DIE LEBER (Zu Abb. 3)

Während bei Thyroxin, Trijodthyronin und Thyroxamin die Wirkungen auf den Leber-cholesterinspiegel gleichsinnig waren, (anfänglicher Anstieg in der ersten halben Stunde, um dann in der darauffolgenden halben Stunde wieder, nicht ganz bis zur Norm, abzufallen. In der zweiten Stunde trat bei Thyroxin und Trijodthyronin ein neues Maximum auf, bei Thyroxamin hielt der Anstieg bis zur vierten Stunde an) zeigte 2,4-Dinitrophenol praktisch keine Wirkung. Tetrajodthyreoessigsäure verhielt sich umgekehrt wie die ersten 3 Substanzen: In der ersten halben Stunde zeigte sich ein Abfall, um nach einer Stunde in einem Gipfel ein Maximum zu erreichen. In der zweiten Stunde fielen die Werte unter die Norm.

WIRKUNG DER SUBSTANZEN AUF DEN HERZMUSKEL (Zu Abb. 4)

Innerhalb der ersten Stunde (bei Tetrajodthyreoessigsäure schon nach einer halben Stunde) war bei dem Herzmuskel ein Maximum erreicht, welches dann bis zur zweiten Stunde abfiel; bei Tetrajodthyreoessigsäure, Thyroxin und 2,4-Dinitrophenol fiel der Cholesteringehalt bis in die Nähe der Norm, beim Trijodthyronin und Thyroxamin fiel er sogar darunter, um dann bei den beiden letztgenannten Substanzen in der vierten Stunde wieder stark anzusteigen.

WIRKUNG DER SUBSTANZEN AUF DIE QUERGESTREIFTE MUSKULATUR (Zu Abb. 5)

Ähnlich wie beim Herzmuskel war auch bei der quergestreiften Muskulatur in der ersten Stunde ein Gipfel zu verzeichnen, bei Tetrajodthyreoessigsäure sogar wieder schon schon nach einer halben Stunde. In der zweiten Stunde war überall ein steiler Abfall zu erkennen. Bei Tetrajodthyreoessigsäure, Trijodthyronin und 2,4-Dinitrophenol stieg der Wert wieder langsam an, während er bei Thyroxin und Thyroxamin noch weiter abfiel. Von allen Substanzen zeigte 2,4-Dinitrophenol auch hier wieder die schwächste Wirkung.

WIRKUNG DER SUBSTANZEN AUF DIE NIEREN (Zu Abb. 6)

Wie bei der Leber (Abb. 11), so war auch bei den Nieren die Wirkung von Thyroxin, Trijodthyronin und Thyroxamin weitgehend gleichgerichtet: In der ersten Stunde ein Maximum, in der zweiten Stunde ein Abfall, um dann anschließend beim Trijodthyronin und Thyroxamin über die Norm anzusteigen. 2,4-Dinitrophenol hatte auch hier nur eine schwache Wirkung gezeigt. Ebenso wie bei der Leber, war auch bei den Nieren die Wirkung der Tetrajodthyreoessigsäure den Wirkungen der ersten 3 Substanzen entgegengerichtet: Abfall in der ersten Stunde, Maximum in der zweiten Stunde und dann wieder ein neuer Abfall.

WIRKUNG DER SUBSTANZEN AUF DEN CHOLESTERINSPIEGEL IM SERUM (Zu Abb.7)

Die Jodthyronine und deren Derivate zeigten einen sofortigen Abfall des Serumcholesterins. Thyroxin zeigte allerdings eine Latenzzeit von einer halben Stunde, dann stiegen die Werte etwas an, blieben aber unter der Norm. 2,4-Dinitrophenol dagegen bewirkte einen Anstieg der Cholesterinwerte. Nach Erreichung eines Tiefpunktes in der zweiten Stunde, kehrten die Werte in der vierten Stunde wieder zur Norm zurück.

Dünnschichtchromatographie

Eine quantitative Auswertung der Dünnschichtchromatogramme war aus methodischen Gründen sehr schwierig. Deshalb legten wir in dieser Arbeit das Hauptgewicht auf die Cholesterinbestimmung mit dem Autoanalyzer. An dieser Stelle soll nun auf einzelne charakteristische Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie eingegangen werden.

Die Abbildungen 8 - 13 sind Extinktionskurven dünnschichtchromatographischer Platten. Die Extinktionen wurden mit dem Spektrophotometer von Zeiß PMQ 2 auf die schon oben beschriebene Weise gemessen.

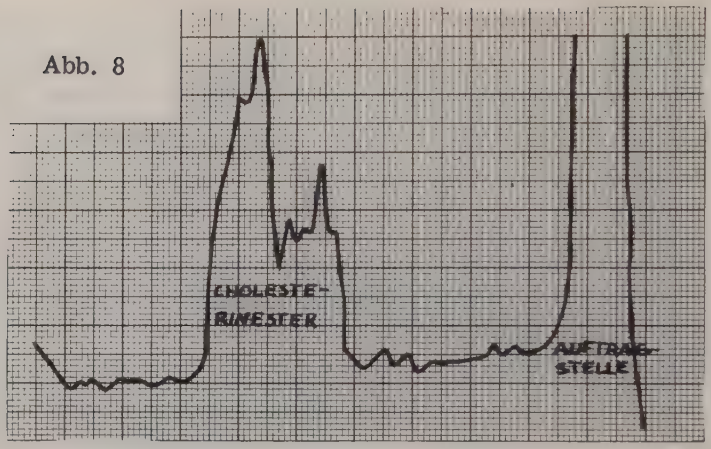

ABB. 8

Abb. 8 zeigt die Extinktionskurve der dünnschichtchromatographischen Serumdarstellung 4 Stunden nach Injektion von 2,4-Dinitrophenol. Material: Dünnschicht: Kieselgel G nach Stahl/Schichtdicke: 0,25 mm/Auftragmenge: 10 µl/Laufsystem: 99 %-iger Petroläther, 1 % Isopropanol/Färbung: bei 532 m µl.

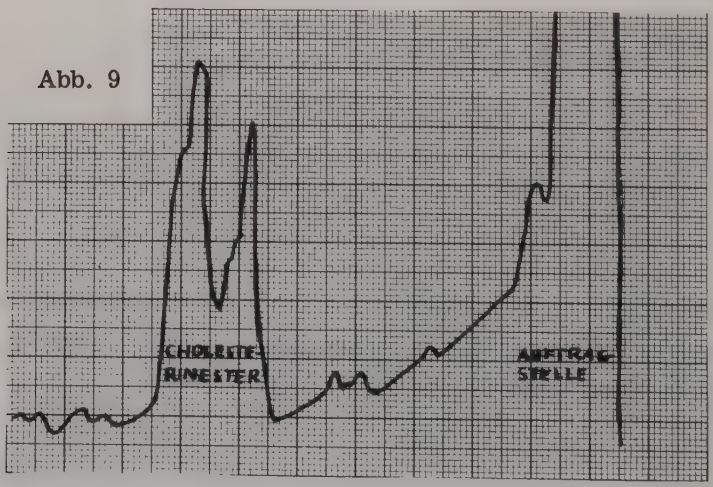

ABB. 9

Abb. 9 zeigt die Extinktionskurve von Normalserum. Material: Dünnschicht:Kieselgel G nach Stahl/Schichtdicke: 0,25 mm/Auftragsmenge: 10 µl/Laufsystem: 99 %-iger Petroläther und 1 % Isopropyläther/Färbung: 25 g $SbCl_3$ und 75 ml Chloroform/ Extinktionsmessung bei 532 m µ.

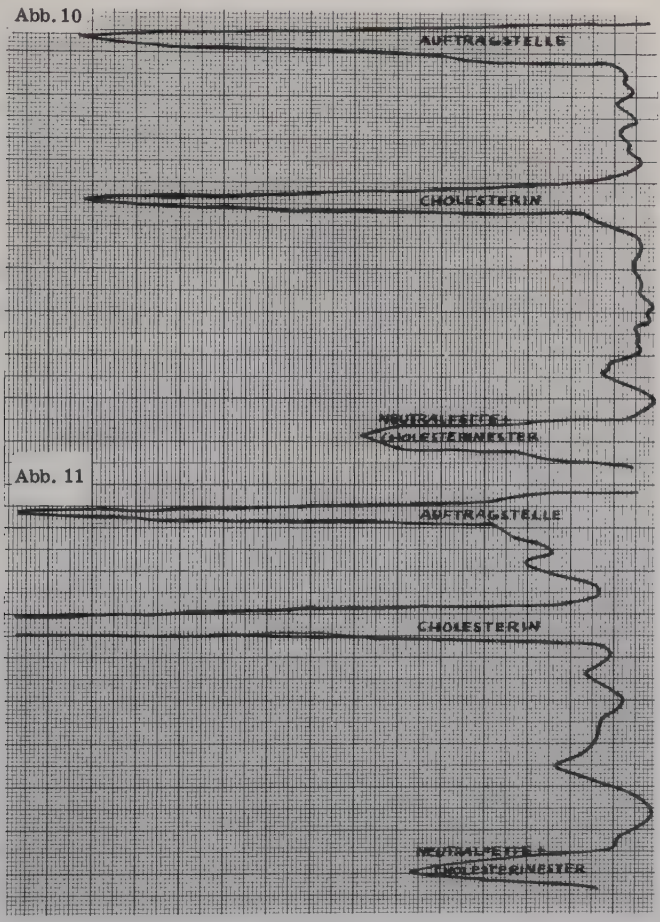

Abb. 10 zeigt die Extinktionskurve der dünnschichtchromatographischen Leberdarstellung, 2 Stunden nach 2,4-Dinitrophenolinjektion. Material: Dünnschicht: Kieselgel G/Schichtdicke: 0,25 mm/Auftragmenge 10 µl/Laufsystem: Chloroform/Färbung: Phosphormolybdänsäure/Extinktionsmessung bei 575 m µ.

Abb. 11 zeigt die Extinktion von Normalleberextract. Material siehe unter Abb. 10. Laufrichtung: von oben nach unten, Extinktion von rechts nach links.

Abb. 12

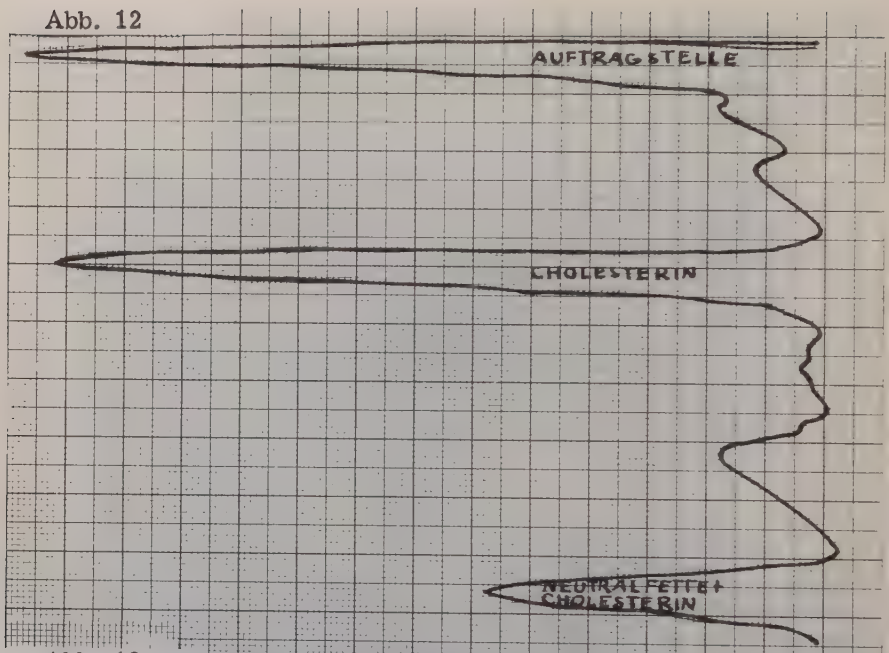

Abb. 13

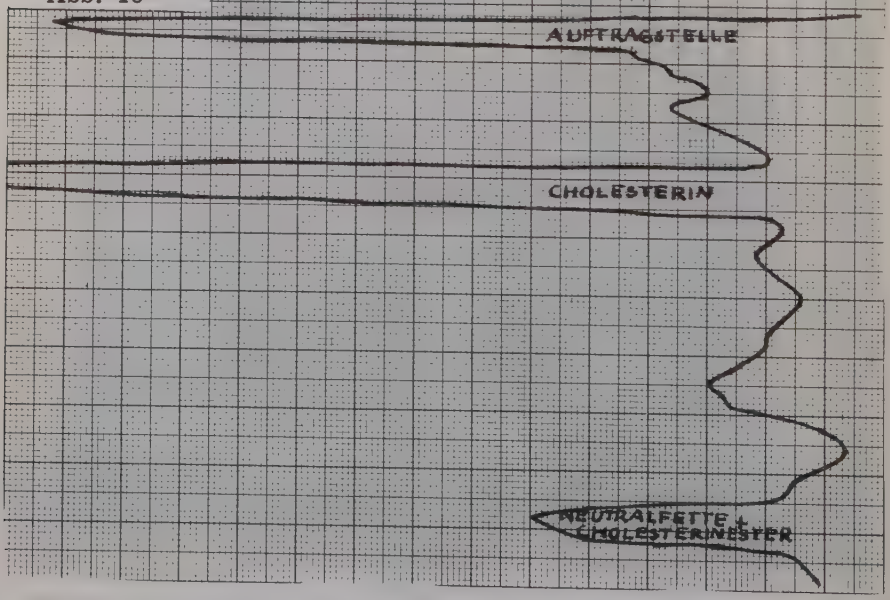

ABB. 12 und 13

Abb. 12: Extinktionskurve der dünnschichtchromatographischen Leberdarstellung. Sie zeigt den Leberextrakt, der 4 h nach Tetrajodthyreoessigsäureinjektion gewonnen wurde. Material: Dünnschicht: Kieselgel G/Schichtdicke 0,25 mm/Laufsystem: Chloroform/Färbung: Phosphormolybdänsäure/Extinktionsmessung bei 575 m μ/Laufrichtung: von oben nach unten/Extinktion: von links nach rechts.

Abb. 13: Extinktionskurve von Lebernormalextract. Material s. Abb. 12.

Die nun folgenden Abbildungen stellen eine Auswahl von photographischen Aufnahmen der Dünnschichtchromatographien dar. Die untersten Banden sind die Auftragstellen bzw. der Start. Die dichten Banden in der Mitte (Rf - Wert zwischen 0,4 und 0,5) der Laufstrecke stellen das Cholesterin dar. Die Banden am oberen Plattenende sind Neutralfette und Cholesterinester. Der erste Lauf dient als Kontrolle (Organextract unbehandelter Tiere). Der zweite Lauf ist der Extract, der 30 min. nach der Injektion erhalten wurde, der dritte Lauf nach einer Stunde, der vierte Lauf nach zwei Stunden und der fünfte Lauf nach vier Stunden.

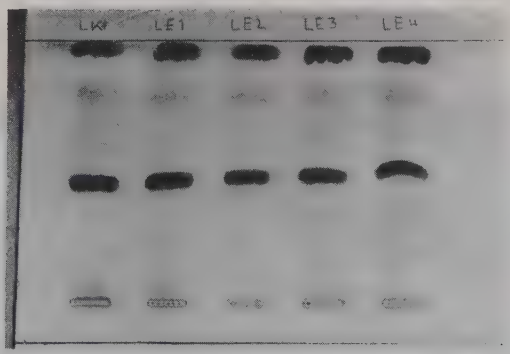

ABB. 14

Abb. 14 zeigt den Leerwert und die vier (30 min, 1 h, 2 h, 4 h) nach der Injektion von Thyroxamin erhaltenen Leberextrakte. Es fällt daran auf, daß zwischen den Lipiden am oberen Ende der Laufstrecke und dem Cholesterin in der Streckenmitte 2 schwache Banden auftreten.

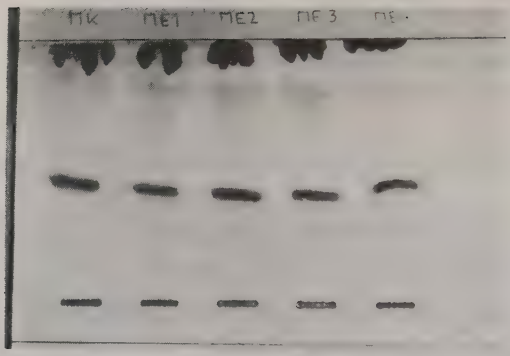

ABB. 15

Beim quergestreiften Muskel findet sich nach Thyroxaminapplikation (Abbildung 15) auch eine schwache Bande zwischen Lipiden und Cholesterin. Am Gehirn (es war in 10-facher Verdünnung aufgetragen) sind nach Thyroxamingaben (Abb. 16) und im Serum nach Trijodthyroningaben (Abb. 17) keine Besonderheiten festzustellen.

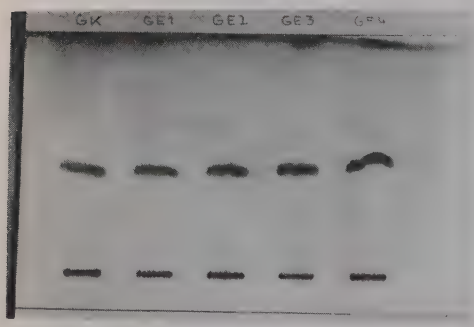

ABB. 16

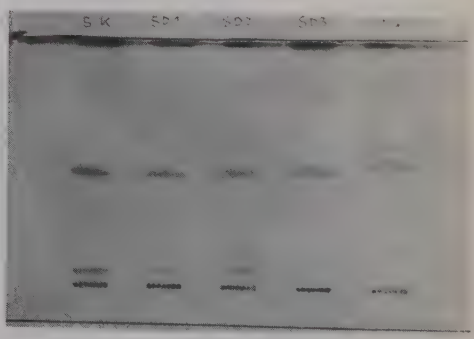

ABB. 17

An der Niere (Abb. 18) bemerkt man nach Tetrajodthyreoessigsäureapplikation unmittelbar unter den Lipidbanden beim Leerwert, 30 min, zwei und vier Stunden nach der Applikation eine stark gefärbte Bande, welche eine Stunde nach der Injektion fehlt. Dafür treten zwei, sich schwach anfärbende Banden zwischen Auftragstelle und Cholesterinbande auf.

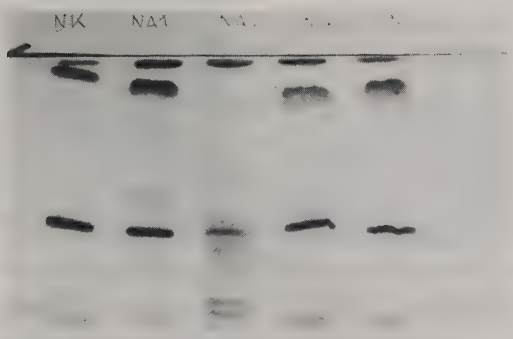

ABB. 18

Die Abb. 19 - 23 zeigen das Verhalten der Herzextrakte. Abb. 19 ist der Lipoidextract nach Thyroxininjektion. Abb. 20 zeigt den Lipoidextract nach Thyroxamingabe, und Abb. 21 nach Trijodthyronininjektion.

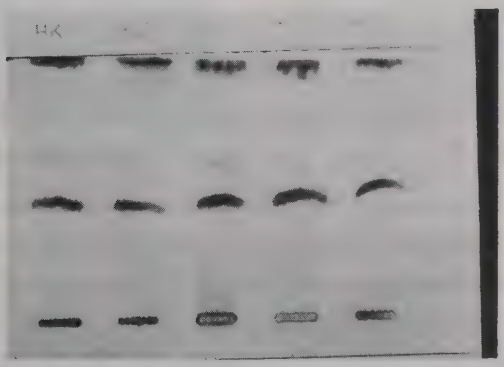

ABB. 19

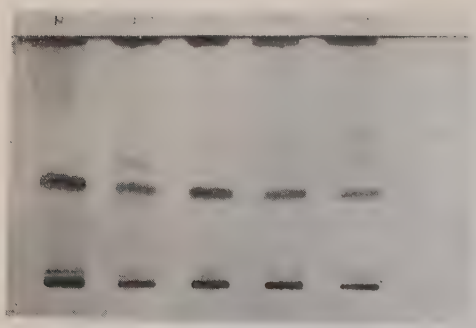

ABB. 20

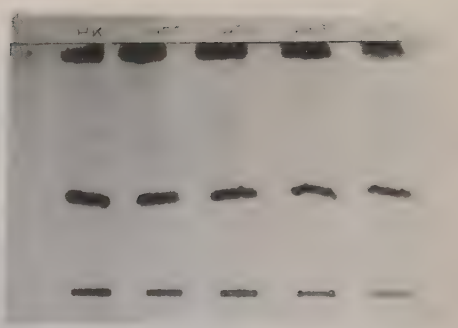

ABB. 21

Abb. 22 zeigt den Lipoidextract nach Tetrajodthyreoessigsäure und Abb. 23 nach 2,4-Dinitrophenol.

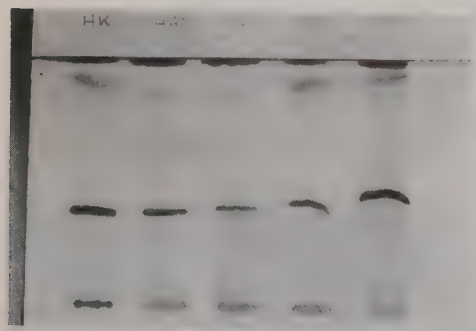

ABB. 22

ABB. 23

DISKUSSION

An den beschriebenen Ergebnissen fällt auf, daß die Wirkung des Schilddrüsenhormones und einiger seiner Analoge, auf den Fettstoffwechsel kurze Zeit (zwischen 30 Minuten und zwei Stunden) nach der Applikation auftritt, also lange bevor irgendeine Grundumsatzwirkung feststellbar ist (die frühesten Grundumsatzsteigerungen sind erst nach vier bis sechs Stunden bemerkbar).

Außerdem ist aus den oben beschriebenen Ergebnissen ersichtlich, daß die Wirkung von Thyroxin, Trijodthyronin und Thyroxamin auf die Leber gleichsinnig ist, während der zeitliche Verlauf des Lebercholesteringehaltes nach Applikation von Tetrajodthyreoessigsäure den obengenannten Wirkungen entgegenläuft. Bemerkenswert ist noch, daß 2,4-Dinitrophenol kaum einen Effekt zeigt. Die Wirkungen auf den Herzmuskel und auf die quergestreifte Muskulatur sind einander sehr ähnlich, weil beide Muskelarten in Bau und Funktion sowie Stoffwechsel eine nahe Verwandtschaft aufweisen. Bemerkenswert ist die besonders schnell einsetzende Wirkung der Tetrajodthyreoessigsäure. Einen auffälligen Befund stellte noch der Cholesterinanstieg im Gehirn nach 2,4-Dinitrophenolapplikation dar, während bei den anderen Substanzen ein Abfall zu verzeichnen war. Die starke Wirkung auf den Gehirncholesteringehalt ist besonders bemerkenswert, da das Dinitrophenol bei Leber, Niere, Herz und quergestreifter Muskulatur die schwächste Wirkung aller injizierten Substanzen zeigte.

ZUSAMMENFASSUNG

Mäusen wurden 3×10^{-9} Mol Thyroxin, Thyroxamin, Trijodthyronin, Tetrajodthyreoessigsäure oder 2,4-Dinitrophenol intraperitoneal injiziert. Nach einer halben Stunde, nach einer Stunde, nach zwei und vier Stunden wurden aus jeder der fünf Serien (jede Serie bestand aus 40 Tieren) 10 Mäuse getötet und aus folgenden Organen Lipoidextracte hergestellt: Leber, Gehirn, Nieren, Herz, quergestreifte Muskulatur und Serum. Diese Extracte wurden mit dem Autoanalyzer auf ihren Cholesteringehalt untersucht. Die Applikation der Wirkstoffe führte zu unterschiedlichen Veränderungen des Cholesteringehaltes in den einzelnen Organen. Besonders auffällig war die schnell einsetzende Wirkung (zwischen 30 Minuten und zwei Stunden), also lange bevor eine Grundumsatzwirkung feststellbar ist. Außerdem ergab sich am Gehirn noch ein bemerkenswerter Befund: In der ersten halben Stunde fiel der Cholesterinspiegel signifikant ab, erreichte in der zweiten Stunde ein Maximum und fiel bis zur vierten Stunde wieder ab. 2,4-Dinitrophenol zeigte von der zweiten bis zur vierten Stunde einen sehr starken Anstieg des Cholesterins und zwar um 50 % über die Norm.

LITERATURVERZEICHNIS

11. Hoch, F., Physiological Reviews, Vol. 42, No. 4, Octobre 1962.
22. Niemann, Redemann, J. Am. Chem. Soc. 63: 1549-1552, 1941.
3. Sokoloff, Kaufmann, Gelboin, Biochim. Biophys. Acta 52, 410-412, 1961.
4. Trapani, Federation Proc. 19 (Suppl. 5) 109-114, 1960.
5. Potop, Biokhimia 23: 8-12, 1958.
6. Murano, Yasuda, Rhee, Uenshi, Ueda, Osaka City Med. J. 6: 91-104, 1960. Chem. Abstr. 55: 19015h, 1961.
7. Williams, Egana, Robinson, Asper, Dutoit, Arch. Internal. Med. 72: 353-371, 1943.
8. Labuoesse, Chatagner, Jollès-Bergeret, Biochim. Biophys. Acta 39: 372-374, 1960.
9. Mascitelli, Coriandoli, Boldrini, Experientia 16: 546-547, 1960.
10. Rawson, Rall, Sonenberg, Academic Press, Inc., 1955, Vol. 3, pp. 433-519.
11. Drill, Truant, Endocrinology 40: 259-264, 1947.
12. Rawson, Rall, Pearson, Robbis, Popell, West, Am. J. Med. Sci. 226: 405-411, 1953.
13. Scaife, Migikowsky, Can. J. Biochem. Physiol. 324: 15-23, 1957.
14. Marx, Gustin, Levi, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 83: 143-146, 1953.
15. Friedemann, Byers, Gunning, Circulation.
16. Fletcher, Myant, J. Physiol. (London) 154: 145-152, 1960.
17. Hung, A. Compt. Rend. Soc. Biol. 153: 1007-1009, 1959.
18. Gershberg, Kuhl, J. Clin. Invest. 29: 1625-1632, 1950.
19. Turchetto, Sanguinetti, Rossi. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 31: 1324-1326, 1955.
20. Tabachnick, Bonnycastle, Salter. J. Biol. Chem. 207: 757-760, 1954.
21. Fletcher, Myant, J. Physiol. (London) 154: 145-152, 1960.
22. Flock, Bollmann, Berkson.
23. Entenman, Chaikoff, Reichert. Endocrinology 30, 802, 1942.
24. Ershoff, Marx, Exp. Med. 6. 145, 1948. Greenberg, Deuel, J. Nutrit. 42, 279, 1950.
25. Peters, Schwatz, Man, J. Clin. Invest. 22. 715, 1943. Gräsböck, Lamberg, Acta Endocr. Kbhvn. 19. 82, 1955. Strisower, Hofman, Gallioni, Rubinger, Pouteau und Guzwich, Lancet II, 120, 1957.

26. Abelin, Kirsteiner, Biochem. Z. 198: 19-46, 1928.

27. Rich, Bierman, Schwartz, J. Clin. Invest. 38: 275-278, 1959.

28. Goodman, Knobil, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 100, 195, 197, 1959.

29. Hagen, J. Biol. Chem. 235: 2600-2603, 1960.

30. Dietrich, Smith, Biochem. Pharmacol. 3: 85-88, 1960.

31. Hoch, Lipmann. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 40: 909-921, 1954.

32. Trotter, Ciba Foundation Colloquia Endocrinology 10, 276, 1957.

33. Dauber, Horlick, Katz, Amer. Heart. J. 38, 25, 1959.

34. Wainfan, Marx, Rittenberg, Arch. Biochem. Biophys. 51: 519-520, 1954.

35. Zöllner, Klinische Wochenschrift 15, III, 1962.

LEBENSLAUF

Am 30. 8. 1938 wurde ich, Siegfried Gerhard Mall, als Sohn des Assistenzarztes Gerhart Mall und seiner Ehefrau Elisabeth Mall, geb. Zwanger, in Tübingen geboren.

Vom Herbst 1944 bis Frühjahr 1958 besuchte ich folgende Schulen: 1944-1945 die Volksschule in Marburg/Lahn, 1945-1949 die Volksschule in Tübingen, 1949-1952 das Uhlandgymnasium in Tübingen, 1952-1955 das Progymnasium in Bergzabern/Pfalz, 1955-1958 das Neusprachliche Gymnasium in Landau/Pfalz, wo ich am 20. 2. 1958 das Abitur bestand.

Am 1. 5. 1958 begann ich an der Universität in Würzburg das Studium der Medizin. Vom 1. 11. 1958 bis zum 26.6.1964 studierte ich an der Universität in Tübingen, wo ich am 30. 10. 1959 das Vorphysikum, am 29. 3. 1961 das Physikum und am 26. 6. 1964 das Medizinische Staatsexamen mit der Note "gut" bestand.

Vom 1. 7. 1964 - 31. 8. 1964 arbeitete ich als Medizinalpraktikant an der Nervenklinik Landeck/Pfalz und vom 1. 9. 64 an im Städtischen Krankenhaus in Landau/Pfalz.

Photodruck und Buchbinderarbeiten
PAUL JLLG Photo-Offsetdruck, Stuttgart-S, Olgastraße 66a